



# MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI



REC'D 09 AUG 1999

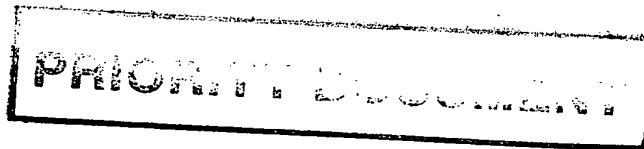
WIPO PCT

EP 99/3075

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per INV. IND.

N. MI98 A 001004

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*



R ma, li 18 MAG 1999

IL REGGENTE

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

D.ssa Paola DI CINTIO

*Paola Di Cintio*

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA  
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **FONDAZIONE CENTRO SAN RAFFAELE DEL MONTE TABOR**  
Residenza **Milano** codice **03064280153**  
2) Denominazione  
Residenza codice

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome **Bianchetti Giuseppe ed altri** cod. fiscale  
denominazione studio di appartenenza **Bianchetti o Bracco o Minoja s.r.l.**  
via **Rossini** n. **8** città **Milano** cap **20122** (prov) **MI**

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via n. città cap (prov)

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/scl) **C12N** gruppo/sottogruppo **15/00**

**"Fibroblasti modificati geneticamente e loro uso"**

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA

N° PROTOCOLLO

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) **Mavilio Fulvio** 3)  
2) 4)

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato  
S/R

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

1) 2)

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) **2** PROV n. pag. **26** riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)  
Doc. 2) **0** PROV n. tav. disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)  
Doc. 3) **0** RIS lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale  
Doc. 4) **0** RIS designazione inventore  
Doc. 5) **0** RIS documenti di priorità con traduzione in italiano  
Doc. 6) **0** RIS autorizzazione o atto di cessione  
Doc. 7) **0** nominativo completo del richiedente

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

8) attestati di versamento, totale lire

**cinquecentosessantacinquemila#**

obbligatorio

COMPILATO IL **08 05 1998**

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

**Minoja Fabrizio**

CONTINUA S/NO

**NO**

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA S/NO

**SI**

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

**MILANO**

codice **15**

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

**MI 98/A 001004**

Reg. A

L'anno millenovecento

**NOVANTOTTO**

il giorno

**OTTO**

del mese di

**MAGGIO**

Il (i) richiedente (i) sopraindicato (i) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredate di n. **00** gli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE

**Biglia Michele**  
IL DEPOSITANTE

timbro  
dell'ufficio

**CORTONESI MAURIZIO**  
L'UFFICIALE ROGANTE

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA

7198 A 001004

REG. A

NUMERO BREVETTO

DATA DI DEPOSITO

08/05/1998

DATA DI RILASCIO

PROSPETTO A

A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

Residenza

D. TITOLO

"Fibroblasti modificati geneticamente e loro uso"

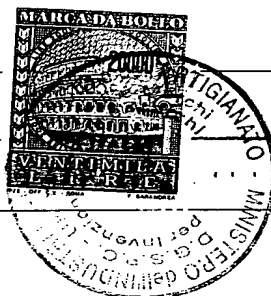
Classe proposta (sez./cl./scl/)

(gruppo/sottogruppo)

L. RIASSUNTO

Vengono descritti un metodo per la preparazione di fibroblasti esprimenti un gene del "lineage commitment" muscolare modificati geneticamente, e le loro applicazioni nel trattamento di difetti genetici o nella produzione di proteine terapeutiche.

M. DISEGNO



5512 M Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

PB/as "FIBROBLASTI MODIFICATI GENETICAMENTE E LORO USO" MI 58 A 1004

a nome : FONDAZIONE CENTRO SAN RAFFAELE DEL MONTE TABOR  
con sede in: Milano

\* \* \*

28 MAG. 1998

La presente invenzione riguarda un metodo ex-vivo per la conversione miogenica di fibroblasti geneticamente modificati, per uso nella correzione di difetti congeniti a carico del sistema muscolare, quali le miopatie monogeniche primarie, o nella produzione di proteine terapeutiche. Inoltre, l'invenzione è diretta all'uso dei fibroblasti geneticamente modificati per la preparazione di composizioni per impianti cellulari destinati al trattamento delle patologie muscolari d'origine genetica, o per la secrezione in vivo di proteine ricombinanti di importanza terapeutica. In particolare, l'invenzione trova applicazione nel trattamento delle distrofie muscolari, che costituiscono un gruppo eterogeneo di gravi malattie degenerative del muscolo provocate da mutazioni nei geni che codificano per la proteina associata a membrana distrofina o per altri membri del complesso distrofina-proteina associata che collega il citoscheletro della fibra muscolare alla matrice extracellulare.

Finora, i tentativi di correggere la distrofia muscolare con la terapia genica basata sull'impianto di cellule staminali del muscolo, o di altra derivazione, hanno trovato enormi difficoltà nell'isolamento di un numero adeguato di cellule miogeniche da modificare geneticamente o nella scarsa resa di conversione fenotipica delle stesse. Per esempio,

la difficoltà di ottenimento di un numero ragionevole di cellule satelliti da modificare geneticamente costituisce un limite per la terapia genica di pazienti con distrofia di Duchenne o distrofia muscolare di Becker (Salvatori, G., et al., 1993; Webster, C. et al., 1990). Altre problematiche connesse con l'impianto di cellule geneticamente modificate in pazienti distrofici sono rappresentate dall'immunogenicità dei vettori virali, dalla difficoltà di sviluppare una efficace via di somministrazione e dalla scarsa sopravvivenza delle cellule iniettate. Inoltre, è stato riportato che l'espressione della stessa distrofina genera risposte immunitarie cellulari e/o umorali in pazienti distrofina-deficienti (New England J. of Medicine 333, 732-733, 1995).

E' noto ormai da tempo che l'espressione di MyoD e di altri membri della famiglia miogenica dei fattori di trascrizione "helix-loop-helix", può attivare la miogenesi in cellule non muscolari (Davis, R. L., et al., 1987; Cossu, G., et al., 1996; Cossu, G., 1997). Lo stesso autore della presente domanda ha recentemente riportato che i fibroblasti subiscono un differenziamento miogenico quando vengono co-coltivati con linee miogeniche (C2C12) o con cellule primarie, ma non con altri tipi cellulari (Breton, M., et al., 1995; Gibson, A.J., et al., 1995; Salvatori, G., et al., 1995). WO 95/12979 descrive un metodo generale per indurre il differenziamento delle cellule verso un nuovo fenotipo, ad esempio verso il fenotipo muscolare attraverso l'introduzione nelle cellule di sequenze geniche di fattori quali MyoD, miogenina, Myf-5 e MRF4. Lo stesso documento non contempla la possibilità di convertire al

fenotipo miogenico cellule modificate geneticamente per renderle idonee ad interventi di terapia genica ed inoltre non contempla la possibilità di effettuare "ex vivo" il trattamento per la conversione miogenica.

GB 2293604 descrive l'uso di fibroblasti per il trattamento delle patologie muscolari, dove gli stessi fibroblasti possono essere trasformati con un gene ad attività terapeutica, per esempio con il gene per la distrofina, mentre non viene considerata la possibilità di indurre il differenziamento con fattori miogenici.

In base a quanto detto, appaiono evidenti i vantaggi di un metodo che consenta di avere un alto numero di cellule convertibili al fenotipo miogenico, dopo che le stesse siano state modificate geneticamente ex-vivo in modo da correggere un difetto genetico, come la distrofia muscolare, o una qualsiasi altra disfunzione legata per esempio ad una insufficiente o errata produzione di una proteina o di un fattore plasmatico o di altre proteine secrete o circolanti, come nel caso del diabete, dell'emofilia, del nanismo ipofisario.

Si è ora trovato che è possibile convertire al fenotipo muscolare, con un procedimento ad elevata efficienza, fibroblasti che sono stati modificati geneticamente in modo da produrre efficacemente proteine terapeutiche o proteine che servano a correggere difetti genetici, in particolare la distrofia muscolare.

Secondo un primo aspetto, l'invenzione fornisce un metodo ad alta efficienza per la preparazione di fibroblasti esprimenti geni del "lineage commitment" muscolare modificati geneticamente, che comprende:

a) la trasduzione ex-vivo di fibroblasti con un gene terapeutico o con

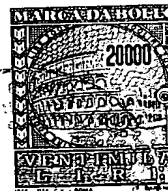
un gene in grado di correggere un difetto genetico;

- b) l'induzione dell'espressione transitoria del gene del "lineage commitment" muscolare nei fibroblasti trasdotti come al punto (a), attraverso la trasformazione delle cellule con un vettore virale, preferibilmente scelto tra baculovirus, virus adeno-associati e, più preferibilmente, adenovirus, oppure altri sistemi di veicolazione del DNA non virali ad alta efficienza, quali i liposomi, i complessi nucleoproteici, le polietilenimine, dove il gene del "lineage commitment" muscolare sia posto sotto il controllo di un promotore forte, preferibilmente un promotore virale.

Per gene del "lineage commitment" muscolare si intende qualsiasi gene in grado di convertire i fibroblasti al fenotipo miogenico, in particolare i geni MyF-5, MRF4, miogenina e, preferibilmente, Myo-D.

Tra i geni terapeutici che possono essere trasdotti nei fibroblasti prima della conversione miogenica si possono citare, ad esempio, i geni responsabili delle varie forme di distrofie muscolari, quali i geni per sarcoglicani, emerina e, preferibilmente, distrofina, oppure i geni codificanti per proteine plasmatiche circolanti quali i fattori della coagulazione o l'insulina, per ormoni quali l'ormone della crescita, o di altro genere, quali ipoxantina-guanina fosforibosil trasferasi, adenosina deaminasi, nucleoside purinico fosforilasi, glucocerebrosidasi, recettore delle lipoproteine a bassa densità, fenilalanina idrossilasi, arginino succinato sintetasi e aril-sulfatasi.

Un secondo aspetto dell'invenzione riguarda fibroblasti modificati geneticamente, esprimenti un gene del "lineage commitment" muscolare,



preferibilmente Myo-D, in modo transitorio, ottenuti con il metodo descritto.

La conversione dei fibroblasti al fenotipo miogenico, attuata attraverso l'espressione transitoria di un gene del "lineage commitment" muscolare, si è rivelata sorprendentemente efficace rispetto ad altre tecniche note all'esperto del settore. Infatti, la co-coltivazione dei fibroblasti con cellule satelliti, il trattamento con desametasone e la trasfezione con calcio fosfato, lipofectamina, o l'elettroporazione dello stesso plasmide esprimente MyoD, hanno fornito una percentuale di conversione miogenica variabile tra l'1% e il 14%, contro valori superiori al 70% nel caso di infezione con vettore adenovirale ricombinante. Si è inoltre osservato che l'efficienza di conversione aumentava linearmente per valori di m.o.i. compresi tra 500 e 2000, mentre la citotossicità ai valori massimi di m.o.i. ("multiplicity of infection") si manteneva entro limiti accettabili. Risultati simili sono stati ottenuti impiegando fibroblasti umani e di topo, mentre per quanto riguarda la derivazione tissutale, i fibroblasti di origine dermica hanno dato i risultati migliori. Uno dei principali vantaggi del metodo descritto è che l'espressione transitoria del gene del "lineage commitment" muscolare esogeno attiva il corrispondente gene endogeno e conduce irreversibilmente le cellule alla miogenesi, rendendo così inutile l'espressione permanente del transgene. L'effettiva conversione miogenica dei fibroblasti esprimenti MyoD esogeno in maniera transitoria, è stata verificata con analisi immunoistochimica, di microscopia elettronica e di espressione genica di



diversi marcatori muscolo-specifici, quali le catene leggere e pesanti di miosina, la subunità  $\alpha$  del recettore dell'acetilcolina, creatina chinasi M, miogenina e MyoD.

L'alta efficienza del metodo consente di preparare fibroblasti convertiti stabilmente al fenotipo miogenico, dopo manipolazione genetica consistente nell'inserimento del gene terapeutico o del gene che corregge il difetto genetico a livello muscolare. Infatti, il processo di conversione al fenotipo muscolare blocca la replicazione cellulare e permette l'ottenimento di impianti stabili, basati sull'utilizzo di fibre muscolari.

Inoltre, l'efficienza del metodo e la stabilità del prodotto ottenuto con lo stesso, permettono di condurre con successo interventi di terapia genica in cui i fibroblasti geneticamente modificati ed esprimenti un gene del "lineage commitment" muscolare, dopo opportuno trattamento ex-vivo, vengono iniettati nel tessuto muscolare dove sono in grado di ricostituire la fibra muscolare che esprime il gene corretto.

Diverse evidenze hanno dimostrato che i fibroblasti trattati ex-vivo come descritto possono rigenerare le fibre muscolari nei topi, in maniera indistinguibile rispetto alle cellule miogeniche primarie (satelliti), con un effetto protratto nel tempo. Inoltre, a seguito del trattamento non è stata osservata alcuna reazione immunitaria cellulo-mediata nell'area di iniezione dei fibroblasti modificati, mentre è stata rilevata una reazione anticorpale contro le proteine dei fibroblasti infettati dall'adenovirus. Ciò costituisce un notevole

vantaggio in vista dei possibili impieghi di terapia genica, dal momento che l'uso in vivo di vettori adenovirali ha sempre trovato un grosso limite nello scatenamento di reazioni immunitarie mediate da cellule T contro le proteine virali o transgeniche.

Secondo un ulteriore aspetto, l'invenzione si riferisce all'uso di fibroblasti ottenuti con il metodo descritto in precedenza, per interventi di terapia genica "ex vivo" o per la preparazione di composizioni per impianti cellulari stabili basati su fibre muscolari.

Un tipico intervento di terapia genica ex vivo, comprende per esempio il prelievo di fibroblasti di origine dermica da un paziente affetto da una malattia genetica che altera la struttura o la funzionalità muscolare, quale la distrofia, l'amplificazione delle cellule in coltura, la trasduzione ex-vivo con un vettore retrovirale che contiene il gene corretto, e l'induzione della miogenesi mediante infezione con un vettore adenovirale, o di altro genere come indicato in precedenza, contenente il gene del "lineage commitment" muscolare, e la re-iniezione delle cellule modificate nel tessuto muscolare.

Un altro tipico intervento per la preparazione di impianti cellulari basati su fibre muscolari comprende il prelievo di fibroblasti di origine dermica da un paziente affetto da una malattia caratterizzata per esempio dalla carenza di una proteina plasmatica (es diabete, nanismo ipofisario, emofilia) l'amplificazione delle cellule in coltura, la trasduzione ex-vivo con un vettore retrovirale che contiene il gene terapeutico, e l'induzione della miogenesi mediante infezione con un vettore adenovirale, o di altro genere come indicato in precedenza,



macinati con forbici, digeriti con 2 mg/ml di dispasi, e 0,1 mg/ml di collagenasi in tampone fosfato (PBS) per 45 minuti a 37°C, lavati con medium RPMI e pipettati per ottenere una sospensione di cellule singole.

I fibroblasti di midollo osseo di topo transgenico per il gene lacZ a localizzazione nucleare, sono stati ottenuti per risospensione e piastratura di cellule ricavate dalle ossa lunghe di topi MLC3F/nlacZ, di 8-10 settimane. I fibroblasti di midollo osseo umano sono stati ottenuti da donatori sani dopo rimozione delle cellule non aderenti. Tutte le cellule sono state fatte crescere in RPMI supplementato con siero fetale bovino al 15% (FCS), gentamicina 1% e  $\beta$ -mercaptoetanololo 0,3 mM (terreno di crescita). I fibroblasti di midollo umano sono stati supplementati con 2 ng/ml di  $\beta$ FGF.

Il differenziamento miogenico è stato indotto spostando le cellule in RPMI supplementato con siero di cavallo al 2% (terreno di differenziamento). I fibroblasti sono stati purificati attraverso subcolture (almeno 2 cicli) in terreno di crescita. La rimozione delle cellule miogeniche è stata verificata normalmente attraverso la colorazione immuno-citochimica di un'aliquota di cellule subcoltivate per 5 giorni nel terreno di differenziamento.

Per la trasduzione i fibroblasti (dal terzo al decimo passaggio) sono stati infettati con un vettore retrovirale (LBSN) replicazione-difettivo, esprime il gene della  $\beta$ -galattosidasi sotto il controllo del promotore LTR (Salvatori, G., et al. 1993).

Per il passaggio successivo (espressione transiente di Myo-D), le cellule sono state trattate con il vettore adenovirale derivato da Ad5

dopo eliminazione di E1A, che esprime la lunghezza completa del cDNA di MyoD di topo sotto il controllo trascrizionale di LTR di virus di sarcoma di Rous (RSV) (Murry, C. E., et al., 1996). In alcuni esperimenti di controllo, le cellule sono state trasfettate con tecniche standard di precipitazione con calcio fosfato o mediante lipofectamina (Dotap) con 10 µg del plasmide PMC11, contenente il cDNA di MyoD sotto il controllo del promotore CMV.

In alternativa le cellule sono state elettroporate con 6 µg dello stesso plasmide in terreno di crescita a 120 V, 960 mF. Dopo la trasduzione, le cellule sono state fatte crescere per 24 ore in terreno di crescita e poi messe in un terreno di differenziamento per 3-4 giorni o iniettate in vivo.

In alcuni esperimenti le cellule sono state pre-marcate con 0,5 mCi/ml di  $^{14}\text{C}$  timidina (Amersham) per 24 ore e poi esposti al vettore adeno-virale esprimente MyoD ed è stata misurata la sopravvivenza attraverso la conta delle cpm residue incorporate.

#### Esempio 2

Impianto di fibroblasti convertiti con MyoD e geneticamente modificati in muscoli di topo.

1 o 2 milioni di fibroblasti umani o di topo trasdotti (o transgenici) e convertiti mediante espressione transiente di Myo-D sono stati tripsinizzati, risospesi in 20-50 µl di PBS e iniettati in un singolo sito del muscolo anteriore tibiale di topi singenici (C3H) o immunodeficienti (scid/bg) che avevano ricevuto un'iniezione di 30 µl di cardiotoxina (Latoxan)  $10^{-5}$  M 48 ore prima.

In alcuni esperimenti, i fibroblasti di topo convertiti miogenicamente sono stati marcati con il colorante DiI un'ora prima dell'iniezione in vivo (una soluzione allo 0,5% di DiI in etanolo assoluto è stata diluita appena prima dell'uso in saccarosio 0,3 M a una concentrazione finale di 0,05%).

I topi sono stati sacrificati dopo vario tempo, i muscoli sono stati crio-sezionati e colorati per attività  $\beta$ -galattosidasica o preparati per immuno-istochimica. Al momento del sacrificio, il siero è stato raccolto dai topi C3H ed è stato fatto reagire con cellule adeno-infettate o di controllo a varie diluizioni, e successivamente con anticorpi secondari anti-IgG di topo coniugati con fluoresceina.

### Esempio 3

Tecniche di immunocitochimica, microscopia elettronica e analisi di RNA.

L'analisi di immunofluorescenza è stata condotta come descritto (Cusella - De Angelis, M.G., et al., 1994) usando i seguenti anticorpi: MF20, un anticorpo monoclonale che riconosce tutte le miosine sarcomeriche (Bader, D., et al., 1982); un antisiero di coniglio contro proteine sarcomeriche (Tajbakhsh, S., et al., 1994); un anticorpo policlonale anti MyoD (Hasty, P., et al., 1993); BD5, un anticorpo monoclonale che riconosce catene pesanti di miosina (Yasin, R., et al., 1977); un anticorpo policlonale di coniglio contro miosina fetale umana (Edom, F., et al., 1994); un anticorpo monoclonale anti-bromo-desossiuridina (BrdU); anticorpi anti-leu, anti-CD4 e anti-Mac3 di ratto contro gli antigeni di leucociti di topo. Brevemente, le colture delle



N).

I filtri sono stati cross-legati per 2 ore a 80°C sotto vuoto, e ibridati con sonde marcate con  $^{32}\text{P}$  per MyoD e miogenina (Bober, E., et al., 1991), MLC1F e MCK (Lyons, G. E., et al., 1991),  $\alpha$ -subunità del recettore ACh (Boulter, J., et al., 1985) in condizioni standard (Sambrook, J., et al., 1989).

#### Esempio 4

Analisi dei fibroblasti convertiti in vitro al fenotipo miogenico.

Per confrontare il fenotipo indotto da adeno-MyoD con quello di cellule miogeniche primarie, sono stati analizzati diversi marcatori muscolo-specifici attraverso l'analisi immuno-citochimica, di microscopia elettronica e di espressione genica in fibroblasti dermici convertiti umani e di topo, e in cellule satelliti differenzianti di età confrontabile.

Tutti i miotubi differenziati, derivati dalla fusione di fibroblasti dermici di topo convertiti, esprimono le catene pesanti della miosina embrionale veloce, mentre una frazione degli stessi esprime anche le catene pesanti della miosina lenta, come osservato in miotubi derivati dalle cellule satelliti.

In maniera analoga, miotubi derivati dai fibroblasti dermici fetali umani mostrano una meno organizzata sarcomerogenesi iniziale, con sarcomeri allineati e linee Z modellate, come riportato per i miotubi derivati da cellule miogeniche primarie, che non completano mai la sarcomerogenesi in vitro.

Per verificare se l'introduzione di MyoD in fibroblasti primari



attiva anche la trascrizione di geni responsabili per le funzioni di membrana e metaboliche muscolo-specifiche, sono stati misurati per Northern blotting l'espressione di RNA codificanti per proteine muscolo-specifiche come l' $\alpha$ -subunità del recettore dell'acetilcolina (ACh), la creatina chinasi M (MCK), MyoD, miogenina e la catena leggera della miosina veloce (MLC1F), scelti come controlli positivi.

Nessun livello rilevabile di questi messaggeri è stato trovato in fibroblasti non convertiti; d'altra parte, gli stessi mRNA sono risultati espressi a livelli comparabili in miotubi derivati da fibroblasti convertiti e in miotubi derivati da cellule satelliti di età corrispondente.

Pertanto, nelle condizioni analizzate in vitro, i miotubi che derivano da fibroblasti convertiti non sono distinguibili da quelli derivati da cellule miogeniche primarie.

Successivamente si è investigato se i fibroblasti esposti al vettore adenovirale MyoD sono in grado di mantenere la capacità di dividersi dal momento che la sovra-espressione di MyoD ha un effetto anti-proliferativo. Fibroblasti di epidermide fetale umana e di topo sono stati infettati con vettore adenovirale MyoD per 3 ore ad un m.o.i. di 2000 in un terreno senza siero, coltivati per 12 ore in terreno di crescita contenenti 10 mM BrdU, fissati a 12, 24, 48 e 72 ore dopo l'infezione e colorati doppiamente con anticorpi anti-MyoD e anti-BrdU.

24 ore dopo l'esposizione al vettore adenovirale, solo poche cellule esprimenti MyoD avevano incorporato BrdU, mentre nessuna cellula doppiamente positiva veniva rivelata a 48 e 72 ore. Pertanto

l'espressione di MyoD blocca la divisione cellulare in fibroblasti convertiti.

#### Esempio 5

Efficienza di conversione miogenica di fibroblasti umani e murine di diversa derivazione

I fibroblasti sono stati isolati, amplificati in vitro, infettati con il vettore adeno-virale contenente Myo-D per 3 ore ad una m.o.i. di 2000, tenuti in coltura per altre 24 ore e quindi il differenziamento è stato indotto come descritto. La tabella 1 riporta i valori % di conversione.

L'efficienza di conversione è stata misurata come percentuale di cellule esprimenti la catena pesante della miosina sarcomerica come evidenziato da colorazione con un anticorpo anti-miosina (MF20). I valori indicati sono la media di due esperimenti separati, ognuno condotto in triplicato.

Tabella 1

	Murina		Umana	
	Fetale	Adulta	Fetale	Adulta
Derma	70	56	65	42
Muscolo	43	44	40	32
Midollo osseo	ND	6	ND	6

ND: non determinato.

#### Esempio 6

Sopravvivenza di fibroblasti convertiti con Myo-D e di cellule satelliti (da topo MLCF3/LacZ) dopo impianto nel muscolo tibiale anteriore (TA) di topo SCID/bg.

20  $\mu$ l contenenti  $1 \times 10^6$  cellule sono state iniettate in singolo sito nel muscolo T.A. rigenerante di topo SCID/bg.

Ai tempi indicati i topi sono stati sacrificati e sono state preparate sezioni criostatiche di 15  $\mu$ m dal muscolo TA. 1 ogni 5 sezioni sono state colorate con X-gal. I nuclei sono stati contro-colorati con Hoechst. Nelle sezioni colorate con X-gal, è stato contato il No. di nuclei  $\beta$ -gal<sup>+</sup> e moltiplicato per 5 (No. di nuclei totale). Inoltre sono stati contati i nuclei  $\beta$ -gal<sup>+</sup>/totali presenti in aree di 200  $\mu^2$ . I risultati sono riportati in Tabella 2. Si noti che l'aumento del rapporto tra cellule  $\beta$ -gal<sup>+</sup> e totali, è dovuto alla diminuzione delle cellule mononucleate che ricorre progressivamente durante la rigenerazione muscolare (fusione).

Tabella 2

Tempo (settimane)	No. di nuclei $\beta$ -gal <sup>+</sup> /muscolo 0% delle cellule iniettate		No. di nuclei $\beta$ -gal <sup>+</sup> sito di iniezione (200 $\mu^2$ ) 0% nuclei donatori	
	Myo-D fibroblasti	cellule satel- liti	Myo-D fibroblasti	cellule satelliti
0	$1,0 \times 10^6$ (100)	$1,0 \times 10^6$ (100)		
1	$2,1 \times 10^3$ (0,2)	$0,5 \times 10^3$ (0,05)	8/242 (3,3)	2/256 (0,8)
2	$1,8 \times 10^3$ (0,18)	$1,9 \times 10^3$ (0,19)	7/127 (5,5)	6/123 (4,8)
4	$1,6 \times 10^3$ (0,16)	$3,3 \times 10^3$ (0,33)	6/99 (6,0)	8/105 (8,5)
8	$1,9 \times 10^3$ (0,19)	$3,6 \times 10^3$ (0,36)	7/56 (12,5)	12/60 (13,1)

### Esempio 7

Rigenerazione muscolare da parte dei fibroblasti esprimanti MyoD geneticamente modificati

Fibroblasti isolati da epidermide di feto umano sono stati espansi e trasdotti in vitro con uno stock ad alto titolo del vettore retrovirale LBDSN, recante un gene lac Z codificante una forma

citoplasmatica di  $\beta$ -galattosidasi (Salvatori, G., et al., 1993).

L'efficienza di trasduzione, stimata per mezzo del numero di cellule con colorazione  $\beta$ -gal positiva in coltura, era compresa tra il 40 e il 70%, rendendo pertanto non necessaria un'ulteriore selezione delle cellule trasdotte (per esempio, per la resistenza al G418). I fibroblasti trasdotti sono stati esposti al vettore adeno-MyoD a una m.o.i. di 2000, e successivamente iniettati nei muscoli tibiali anteriori rigeneranti di topi scid/bg (106 cellule/muscolo in un'unica iniezione).

L'efficienza della conversione miogenica di fibroblasti trasdotti è stata controllata facendo differenziare in vitro parte della coltura cellulare. In media, circa il 70% dei fibroblasti subivano conversione miogenica in queste condizioni, e la maggior parte dei miotubi (> 90%) risultavano positivi per l'espressione di  $\beta$ -gal citoplasmatica. Dopo 1, 2 e 4 settimane, i topi venivano sacrificati e i muscoli tibiali anteriori sezionati in serie e colorati per attività di  $\beta$ -gal.

Due settimane dopo l'iniezione, fibre  $\beta$ -gal positive furono osservate in 7 su 8 muscoli iniettati. Un ingrandimento più forte rivelava chiaramente fibre che accumulavano il prodotto del gene reporter a livelli variabili, suggerendo una proporzione variabile di cellule iniettate/ospiti nelle fibre  $\beta$ -gal positive.

La presenza e il contributo delle cellule umane alla formazione di nuove fibre sono stati confermati attraverso analisi immunoistochimica usando un anticorpo che riconosce le catene pesanti della miosina fetale umana ma non di topo, la quale analisi dimostrava zone di intensa

espressione di proteine umane muscolo-specifiche nelle aree di rigenerazione.

In generale, il numero medio di fibre  $\beta$ -gal positive per muscolo ottenute per iniezione di fibroblasti umani convertiti era inferiore al numero osservato dopo l'iniezione di fibroblasti di topo, anche se confrontabile col numero di cellule positive osservato in esperimenti in cui erano state usate le cellule satelliti umane trasdotte con lac Z. Questo indica che le cellule umane, come atteso, sono meno efficienti di quelle di topo nel colonizzare un muscolo di topo.

Tuttavia, di maggiore importanza, i fibroblasti umani convertiti si comportano come cellule miogeniche primarie in vivo, in termini sia di numero che di grandezza delle nuove fibre formatesi.

Allo scopo di quantificare più precisamente la sopravvivenza di fibroblasti umani miogenicamente convertiti nel muscolo di topo, è stata condotta un'analisi di "Southern dot-blot" con una sonda Alu, come precedentemente descritto (Salvatori, G., et al., 1993). A questo scopo il DNA è stato estratto da muscoli TA di topi scid-bg due settimane dopo l'iniezione di fibroblasti umani MyoD-convertiti (seguendo lo stesso protocollo sperimentale descritto sopra). Come controllo positivo, lo stesso numero di cellule satelliti umane è stato iniettato nei muscoli TA contro-laterali trattati in maniera simile.

I risultati del "dot-blot" indicavano che approssimativamente lo 0,1% del DNA ricavato dal muscolo TA iniettato con fibroblasti convertiti era di origine umana; d'altra parte questo valore saliva allo 0,3% nel caso del campione iniettato con le cellule satelliti umane.

Dal momento che l'analisi istochimica aveva rivelato che verosimilmente tutta la colorazione di  $\beta$ -galattosidasi era all'interno delle fibre muscolari, si può concludere che i valori osservati riflettono fedelmente la percentuale di nuclei umani incorporati nelle fibre muscolari rigenerate.

#### Esempio 8

Risposta immunitaria contro le cellule esposte ex-vivo al vettore adenovirale.

Uno dei maggiori problemi associati all'uso in vivo di vettori adenovirali in riceventi immuno-competenti è l'induzione di una risposta immunitaria significativa mediata da cellule T contro le proteine virali e il prodotto del transgene(i). Nel modello qui descritto nessuna particella viene iniettata direttamente in vivo. Tuttavia sono state iniettate cellule che sono state esposte al vettore adenovirale in vitro per breve tempo prima della somministrazione.

Ci si aspetterebbe che il DNA adenovirale, non in grado di replicarsi, venga rapidamente diluito ed eventualmente perso in cellule in fase attiva di divisione. L'espressione del transgene MyoD, tuttavia, blocca quasi immediatamente la divisione cellulare nei fibroblasti convertiti, prevenendo così la possibilità di diminuire il vettore adenovirale con una coltura continua.

Per valutare se veniva indotta una risposta immunitaria dalle cellule esprimenti un genoma adenovirale difettoso in vivo, sono stati iniettati  $2 \times 10^6$  fibroblasti C3H di epidermide di topo convertiti a miogenesi per esposizione al vettore adeno-MyoD nel muscolo in

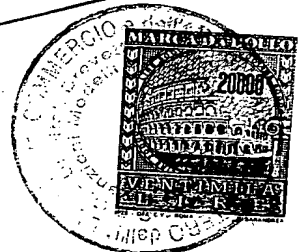
rigenerazione di topi singenici.

Le cellule sono state marcate con DiI prima dell'iniezione e non con un transgene lac Z per evitare una possibile reazione immunitaria contro la proteina  $\beta$ -galattosidasi. Gli animali sono stati sacrificati 7, 14 e 21 giorni dopo l'iniezione, e i muscoli analizzati per la presenza di infiltrato immunitario attraverso immunofluorescenza usando anticorpi contro marcatori cellulari di superficie di leucociti e macrofagi di topo.

Nessun significativo infiltrato immunitario è stato rilevato 3 settimane dopo l'iniezione intorno alle cellule marcate, anche se in questa fase tutti i topi trattati avevano sviluppato anticorpi contro proteine Ad5, che riconoscono fibroblasti C3H adeno-infettati ma non di controllo.

Questi esperimenti indicano che fibroblasti convertiti in vitro attraverso l'esposizione a un vettore adeno-MyoD, e somministrati in vivo per iniezione intramuscolare, non scatenano una risposta immunitaria citotossica mediata da cellule, e conseguentemente difficilmente vengono eliminati dalla stessa.

Al contrario, l'iniezione diretta di un vettore adenovirale in un muscolo rigenerante induceva un forte infiltrato immunitario, come riportato in precedenza (Yang, Y., et al., 1996).



BIBLIOGRAFIA

Salvatori, G., G. Ferrari, A. Mezzogiorno, S. Serivdei, M. Coletta, P. Tonali, R. Giavazzi, G. Cossu, e F. Mavilio. 1993. Retroviral vector-mediated gene transfer into human primary myogenic cells leads to expression in muscle fibers in vivo. Human Gene Ther. 4:713-723.

Webster, C. e, H.M. Blau 1990. Accelerated age-related decline in replicative life span of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: implication for cell and gene therapy. Somatic Cell Mol. Genet. 16:557-565.

Davis, R. L., H. Weintraub, e A.B. Lassar. 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. Cell 51:987-1000.

Cossu, G., S. Tajbakhsh, e M. Buckingham. 1996. Myogenic specification in mammals. Trends Genet. 12:218-223.

Cossu, G. 1997. Unorthodox myogenesis: possible developmental significance and implications for tissue histogenesis and regeneration. Histol. Histopathol. 12:755-760.

Breton, M., Z., Li, D. Paulin, J.A. Harris, F. Rieger, M. Pincon-Raymond, and L. Garcia. 1995. Myotube driven myogenic recruitment of cells during in vitro myogenesis. Develop. Dynam. 202:126-136.

Gibson, A.J., J. Karasinski, J. Relvas, J. Moss, T.G. Sherratt, P.N. Strong, and D.J. Watt. 1995. Dermal fibroblasts convert to a myogenic lineage in mdx mouse muscle. J. Cell Science 108:207-214.

Salvatori, G., L. Lattanzi, M. Coletta, S. Aguanno, E. Vivarelli, R. Kelly, G. Ferrari, J. A. Harris, F. Mavilio, M. Molinaro, e G. Cossu.



1995. Myogenic conversion of mammalian fibroblasts induced by differentiating muscle cells. J. Cell Science 108:2733-2739.

Murry, C. E., M. A. Kay, T. Bartosek, S. D. Hauschka, e S. M. Schwartz. 1996. Muscle differentiation during repair of myocardial necrosis in rats via gene transfer with MyoD. J. Clin. Invest. 98:2209-2217.

Cusella - De Angelis, M.G., S. Molinari, A. Ledonne, M. Coletta, E. Vivarelli, M. Bouchè, M. Molinaro, S. Ferrari, e G. Cossu, 1994. Differential response of embryonic and fetal myoblasts to TGF $\beta$ : a possible regulatory mechanism of skeletal muscle histogenesis. Development 120:925-933.

Bader, D., T. Masaki, e D. A. Fischman. 1982. Immunochemical analysis of myosin heavy chain during avian myogenesis in vivo and in vitro. J. Cell Biol. 95:763-770.

Hasty, P., A. Bradley, J. H. Morris, D. G. Edmondson, J. M. Venuti, E. N. Olson, e W. H. Klein. 1993. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. Nature 375:787-790.

Edom, F., V. Mouly, J. P. babert, M. Y. Fiszman, e G. S. Butler-Browne. 1994. Clones of human satellite cells can express in vitro both fast and slow myosin heavy chains. Develop. Biology 164:219-229.

Yasin, R., K. C. Van Beers, C. E. Nurse, S. Al-Ani, D. N. Landon, e E. J. Thompson. 1977. A quantitative technique for growing human adult skeletal muscle in culture starting from mononucleated cells. J. Neurol. Sci. 32:347-360.

Chomczynski, P., e N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. Anal. Biochem. 162:156-159.

Bober, E., G.E. Lyons, T. Braun, G. Cossu, M. Buckingham, e H.H. Arnold. 1991. The muscle regulatory gene Myf-6 has a biphasic pattern of expression during early mouse development. J. Cell Biol. 113:1255-1265.

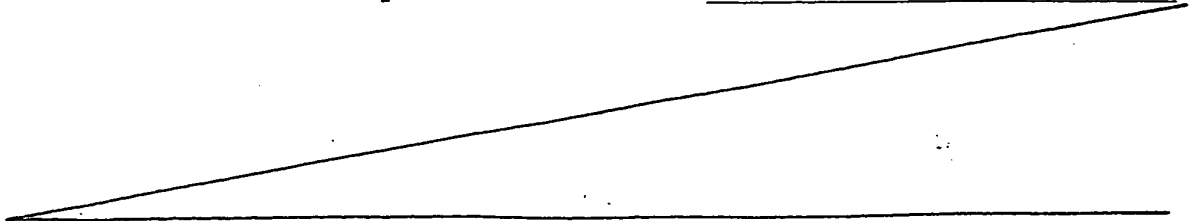
Boulter, J., W. Luyten, K. Evans, P. Mason, M. Ballivet, D. Goldman, D. Stengelin, S. Martin, S. Heinemann, e J. Patric, 1985. Isolation of a clone coding for the  $\alpha$  subunit of a mouse acetylcholine receptor. J. Neurosci. 5:2545-2552.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, e T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Yang, Y., S. E. Haecker, Q. Su, e J. Wilson, 1996. Immunology of gene therapy with adenoviral vectors. Hum. Mol. Genet. 5:1703-1712.

Tajbakhsh, S., E. Vivarelli, M. G. Cusella-De Angelis, D. Rocancourt, M. Buckingham, e G. Cossu 1994. A population of myogenic cells derived from the mouse neural tube. Neuron 13:813-821.

Lyons, G. E., S. Muhlebach, A. Moser, R., Masood, B. M. Paterson, M. Buckingham, e J. C. Perriard. 1991. Development regulation of creatin kinase gene expression by myogenic factors in embryonic mouse and chick skeletal muscle. Development 113:1017-1029.



RIVENDICAZIONI

1. Metodo per la preparazione di fibroblasti esprimenti un gene del "lineage commitment" muscolare, modificati geneticamente, che comprende:

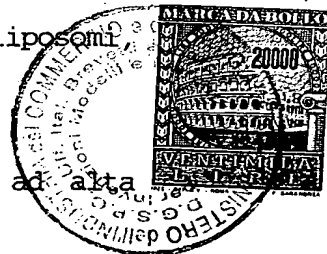
- a) la trasduzione ex-vivo di fibroblasti con un gene terapeutico o con un gene in grado di correggere un difetto genetico;
- b) l'induzione dell'espressione transitoria del gene del "lineage commitment" muscolare nei fibroblasti trasdotti come al punto (a), attraverso la trasformazione delle cellule con un vettore ad alta efficienza, in cui il gene del "lineage commitment" muscolare è posto sotto il controllo di un promotore forte.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui il gene terapeutico è scelto tra i geni codificanti sarcoglicani, emerina, distrofina, fattori della coagulazione, insulina, ormone della crescita, ipoxantina-guanina fosforibosil trasferasi, adenosina deaminasi, nucleoside purinico fosforilasi, glucocerebrosidasi, recettore delle lipoproteine a bassa densità, fenilalanina idrossilasi, arginino succinato sintetasi e aril-sulfatasi.

3. Metodo secondo la rivendicazione 2, in cui detto gene terapeutico è il gene della distrofina.

4. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui il vettore ad alta efficienza è un vettore non virale scelto tra liposomi, polietileneimine e coniugati di nucleoproteine.

5. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui il vettore ad alta efficienza è un vettore virale.



- Milano, 8 maggio 1998

Fluency

